

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**E.A.P. DE ODONTOLOGÍA**

**Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de  
*Allium sativum* sobre cepas estándares de la cavidad  
bucal**

**TESIS**

**Para optar el Título de Cirujano Dentista**

**AUTOR:**

**Evelyn del Rosario Munayco Pantoja**

**ASESOR:**

**Mg. Hilda Moromi Nakata**

**Lima – Perú**

**2011**

**A Dios por ser mi luz y mi guía. A mis  
padres por darme la vida, ser mi apoyo,  
mi razón de seguir adelante. A mi  
hermana por alegrar mi vida. A Frank  
por llenar mi corazón de amor y sueños.  
A ti mamita Dominga por hacer que  
mis sueños se hagan realidad.**

# **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, padre celestial

A mi asesora Mg.Blg<sup>o</sup> Hilda Moromi Nakata, Catedrática Responsable del Curso de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por guiar la tesis.

Al Doctor Fritz Choquesillo Peña, Director del Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.M.S.M., por permitirme usar las instalaciones, para la obtención del extracto.

A la Mg. C.D. Doris Elizabeth Salcedo Moncada, Catedrática de Endodoncia y Cariología de la Facultad de Odontología de la U.N.M.S.M., por su paciencia y apoyo.

Al Mg. C.D. Víctor Manuel Chumpitaz Cerrate, Catedrático de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Odontología de la U.N.M.S.M., por sus aportes.

A los docentes de la Facultad de Odontología de la U.N.M.S.M., que con sus consejos aportaron al desarrollo de la tesis.

A mi familia, amigos y todas las personas que ayudaron en la realización del presente estudio.

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antimicrobiano y antifúngico del extracto de *Allium sativum* frente a las cepas ATCC de *S. mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, *Lactobacillus casei* y *C. albicans* a diversas concentraciones. El extracto se obtuvo por el proceso de maceración, utilizando el ciprofloxacino y el fluconazol como control positivo de las bacterias y hongo, respectivamente; y el alcohol de 70° como control negativo. Al realizar las pruebas de sensibilidad con el extracto a las concentraciones de 12mg/mL, 18mg/mL, 30mg/mL, 60mg/mL, 90mg/mL, 120mg/mL, se obtuvo los siguientes resultados: La concentración antimicrobiana frente al *Capnocytophaga sputigena*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, fue de 120mg/mL, teniendo como referencia al estándar al ciprofloxacino a una concentración de 4mg/ml y fluconazol a una concentración de 2mg/ml. Los resultados tienen una distribución normal al 95 % de nivel de confianza. Con la prueba de Bartlett's, la varianza a distintas concentraciones fue igual con un 95 % de nivel de confianza. La concentración de 120mg/mL, según la prueba de Anova tiene punto de intersección por lo que se planteó un Re-tets. Según esta prueba, la concentración de 120mg/mL comparada con el estándar demostró que los resultados son estadísticamente iguales. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* presentó efecto antimicrobiano frente a la cepa ATCC de *S. mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, y *C. albicans* a excepción de *Lactobacillus casei* que presentó resistencia.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antimicrobial and antifungal effect of the extract of *Allium sativum* against ATCC strains of *S. mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, *Lactobacillus casei* and *C. albicans* at various concentrations. The extract was obtained by the maceration process, using ciprofloxacin and fluconazole as a positive control bacterial and fungus, respectively, and 70° alcohol as a negative control. When performing susceptibility testing with the extract at concentrations of 12 mg / ml, 18mg/mL 30mg/mL, 60mg/mL, 90mg/mL, 120mg/mL, we obtained the following results: The concentration antimicrobial against *Capnocytophaga sputigena*, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, was 120mg/mL, referencing to the standard at a concentration of ciprofloxacin and fluconazole 4mg/ml at a concentration of 2mg/ml. The results are normally distributed at 95% confidence level. With proof of Bartlett's, the variance at different concentrations is equal with 95% confidence level. 120mg/mL concentration, as assessed by the Anova is the point of intersection for what was used a Re-tets. According to this test, the concentration of 120mg/mL compared with the standard showed that the results are statistically equal. It is concluded that the hydroalcoholic extract of *Allium sativum* showed antimicrobial effect against ATCC strain of *S. mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, and *C. albicans* with the exception of *Lactobacillus casei* was resistant.

# CONTENIDO

	Pagina N°
I.- INTRODUCCION	6
II.- MARCO TEORICO	8
2.1 ANTECEDENTES	8
2.2 BASES TEORICAS	16
2.2.1. Plantas medicinales	16
2.2.2. <i>Allium sativum</i>	17
2.2.3 Composición química	17
2.2.4 Alicina	19
2.2.5 Ajoene	20
2.2.6 Propiedad antimicrobiana del <i>Allium sativum</i>	22
2.2.6.1 Propiedades Antiprotozoarias	22
2.2.6.2 Propiedades antibacterianas	23
2.2.6.3 Propiedades antifúngicas	23
2.2.6.4 Propiedades antivirales	24
2.2.7. Microflora bucal- Distribución microbiana	25
2.2.7.1 <i>Streptococcus mutans</i>	28
2.2.7.2 <i>Lactobacillus casei</i>	29
2.2.7.3 <i>Capnocytophaga sputigena</i>	29
2.2.7.4 <i>Candida Albicans</i>	31
2.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
2.4 FORMULACION DEL PROBLEMA	33

2.5 JUSTIFICACION	33
2.6 LIMITACIONES	34
2.7 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	35
2.7.1. Objetivo general	35
2.7.2. Objetivos específicos	35
2.8 HIPOTESIS	35
III.- MATERIAL Y METODOS	36
3.1 TIPO DE ESTUDIO	36
3.2 POBLACION Y MUESTRA	36
3.3 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	37
3.4 MATERIALES	38
3.4.1. Materiales y Equipos de laboratorio para extraer el extracto hidroalcohólico	38
3.4.2. Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo	39
3.4.3. Materiales y Equipos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana	40
3.4.4. Infraestructura	40
3.5 METODOS	41
3.5.1. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO	41
3.5.1.1. Obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Allium sativum</i> por Maceración	41
3.5.1.2. Purificación del extracto hidroalcohólico de <i>Allium sativum</i>	41

3.5.1.3. Esterilización del extracto hidroalcohólico de <i>Allium sativum</i>	41
3.5.1.4. Determinación de la concentración del extracto hidroalcohólico de <i>Allium sativum</i> .	42
3.5.1.5. Determinación de los componentes del extracto hidroalcohólico de <i>Allium sativum</i>	42
3.5.2. PREPACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	44
3.5.2.1 Reactivación de las Cepas bacterianas y fúngicas	44
3.5.2.2. Preparación de los medios de cultivo de acuerdo al tipo de microorganismo.	44
3.5.3. PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	44
3.5.3.1 <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	44
3.5.3.2 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	46
3.5.3.3. <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	47
3.5.3.4. <i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC 33612	48
3.6 ANALISIS DE LOS DATOS	49
IV.- RESULTADOS	50
4.1. EXTRACTO DE <i>Allium sativum</i>	50
4.1.2. ACCIÓN ANTIMICROBIANA	51
4.1.2.1. Acción antimicrobiana frente <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	51
4.1.2.1.1 Prueba de normalidad	53
4.1.2.1.2 Prueba de Bartlett's	53
4.1.2.1.3. Prueba de Anova	53
4.1.2.1.4. Re-Tes Anova	53



4.1.2.2 Acción antimicrobiana frente <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	54
4.1.2.2.1. Prueba de normalidad	56
4.1.2.2.2. Prueba de Bartlett's	56
4.1.2.2.3. Prueba de Anova	56
4.1.2.2.4. Re-Tes Anova	56
4.1.2.3. Acción antimicrobiana frente <i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC 33612	57
4.1.2.3.1. Prueba de normalidad	59
4.1.2.3.2. Prueba de Bartlett's	59
4.1.2.3.3. Prueba de Anova	59
4.1.2.3.4. Re-Tes Anova	59
4.1.2.3.5. Prueba de T-student	59
4.1.2.4. Acción antimicrobiana frente <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	60
V.- DISCUSION	62
VI.- CONCLUSIONES	65
VII.- RECOMENDACIONES	66
VIII.- BIBLIOGRAFIA	67
IX.- ANEXOS	71
FIGURAS:	
Fig. 1: Los compuestos de azufre extraído de ajo en diversas condiciones	18
Fig. 2: Transformación de los principales tiosulfatos en el ajo	19
Fig. 3: Formación de halos de inhibición en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 en Agar Sabouraud	51

Fig. 4: Formación de halos de inhibición en <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 en Agar Mueller-Hinton	54
Fig. 5: Formación de halos de inhibición en <i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC 33612 en Agar Schaedler	57
Fig. 6: Formación de halo de inhibición (control positivo) en <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 en Agar Rogosa	60
Fig. 7: Especímenes de <i>Allium sativum</i>	71
Fig. 8: Obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Allium sativum</i> por Filtración en bomba al vacío	71
Fig. 9: Esterilización del extracto hidroalcohólico de <i>Allium sativum</i>	72
Fig. 10: Bateria de tubos de ensayo conteniendo las diferentes concentraciones del extracto y los controles	72
Fig. 11: Se colocó en cada pozo 60 µL de cada concentración del extracto y los controles	73

#### TABLAS:

Tabla 1: Cultivos de Cepas bacterianas ATCC	44
Tabla 2: Tabla de extracto <i>Allium sativum</i> vs. Fluconazol en cepas <i>Candida albicans</i>	52
Tabla 3: Intervalo de confianza para <i>Candida albicans</i>	52
Tabla 4: Tabla de extracto <i>Allium sativum</i> vs. Ciprofloxacino en cepas <i>Streptococcus mutans</i>	55
Tabla 5: Intervalo de confianza para <i>Streptococcus mutans</i>	55
Tabla 6: Tabla de extracto <i>Allium sativum</i> vs. Ciprofloxacino en cepas <i>Capnocytophaga sputigena</i>	58
Tabla 7: Intervalo de confianza para <i>Capnocytophaga sputigena</i>	58
Tabla 8: Tabla de extracto <i>Allium sativum</i> vs. Ciprofloxacino en cepas <i>Lactobacillus casei</i>	61

# I.- INTRODUCCION

La gran mayoría de los procesos infecciosos microbianos encontrados en la cavidad bucal, son debidos a los microorganismos habituales de la microbiota oral. Esta microbiota oral es extraordinariamente compleja, ya que se han llegado a aislar distintas especies en una misma cavidad bucal en el transcurso del tiempo de los cuales destacan, los cocos grampositivos, los cocos gramnegativos, los bacilos grampositivos, los bacilos gramnegativos y los hongos.

Dentro de los procesos infecciosos podemos mencionar:

- 1.- La caries dental donde están involucrados los estreptococos del grupo mutans, *Lactobacillus* spp y *Actinomyces* spp.
- 2.- Las enfermedades periodontales donde *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, son las principales bacterias implicadas.
- 3.- Infecciones pulpares donde se relacionan estreptococos del grupo viridans, *Lactobacillus* spp, *Neisseria* spp, *Haemophilus parainfluenzae*, *Corynebacterium* spp.

El mayor efecto beneficioso de la microbiota oral es su capacidad para interferir en el establecimiento de patógenos exógenos, sintetizar vitaminas y otros productos.<sup>1</sup>

En vista que el mayor porcentaje de nuestra población presenta bajos recursos económicos, la medicina no tradicional, entre ellos la medicina herbal, trata de buscar alternativas de solución a enfermedades bucales, con hierbas medicinales, como productos económicos y prácticos.

El resurgimiento en el uso de alternativas naturales a base de hierbas ha traído el uso de plantas medicinales a la vanguardia de los estudios farmacológicos, y muchos medicamentos nuevos que se descubren.<sup>2</sup>

Dentro de estas hierbas medicinales, encontramos estudios con llantén, *Plantago major*, que presenta actividad antiinflamatoria en gingivitis inducida,<sup>3</sup> el gel de *Aloe vera*, *Aloe vera* linnaeus, que presenta acción antiinflamatoria a nivel gingival,<sup>4</sup> la muña, *Minthostachys griseb*, que presenta actividad antibacteriana frente a seis microorganismos de la microflora oral,<sup>5</sup> entre otros.

El presente estudio buscó la aplicación del extracto hidroalcohólico del *Allium sativum* frente a bacterias de la cavidad oral, para determinar su acción antimicrobiana partiendo de diseños previos en la cual se llegó a la conclusión de que el extracto hidroalcohólico presenta mejor propiedad antimicrobiana que el extracto acuoso u orgánico.

## **II.- MARCO TEORICO**

### **2.1 ANTECEDENTES**

Ledesma y col<sup>6</sup> en 1998, hace una revisión donde afirma que uno de los extractos alcohólicos del ajo, llamado ajoene, es un potente antiplaquetario capaz de bloquear la respuesta plaquetaria inducida por el colágeno, ADP, epinefrina, etc., además menciona que el mecanismo de acción como agente antimicótico parece estar asociado a perturbaciones que se originan en la integridad de la membrana plasmática, el inducir cambios en su composición lipídica, incrementando el contenido relativo de los esteroides e induciendo fuertes cambios en la composición fosfolipídica.

Lemus y col<sup>7</sup> en el 2004, evaluaron la susceptibilidad in vitro al ajoene, sobre levaduras aisladas de pacientes con onicomicosis, relacionándola con la actividad in vivo mostrada por este compuesto. Para ello fueron seleccionados 8 pacientes con diagnóstico clínico y micológico de onicomicosis. Seis recibieron ajoene en solución al 0,4 % y dos con fluconazol 150 mg/semanal por 4 meses, con controles clínicos y micológicos a los 30, 60 y 90 días. Todos los pacientes tratados con ajoene mostraron después de cuatro meses de tratamiento una importante mejoría de los síntomas y siete de los ocho tratados mostraron cura micológica

Mercado Mamani<sup>8</sup> en el 2006, determinó el efecto antibacteriano del ajo morado en bacterias patógenas de la microflora salival. Fueron recolectadas 43 muestras salivales de personas donantes voluntarias, las cuales fueron cultivadas para su proliferación, con pruebas de identificación bacteriana (catalasa positiva, catalasa negativa, manitol) se logró tipificar las bacterias presentes en la microflora bacteriana salival (*Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus*). Los resultados obtenidos demuestran que la concentración mínima inhibitoria del ajo aplicado en la microflora bacteriana salival es de 0, 8 gr/ml y la concentración mínima bactericida es de 2, 0 gr/ml.

García Rico<sup>9</sup> en el 2007, evaluó el efecto inhibitorio de los extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* sobre cinco cepas bacterianas patógenas de relevancia en la industria alimentaria, como son: *Escherichia coli*, *Pseudomas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.* El extracto de *A. cepa* mostró una mayor actividad antimicrobiana, en comparación con extractos similares de *A. sativum* y *A. fistulosum*. Los extractos de *A. cepa* y *A. fistulosum* mostraron un mayor poder antibacteriano que el extracto de *A. sativum*, en contra de lo que ha sido reportado hasta el momento.

Naupari Amparo<sup>10</sup> en el 2007, determinó la acción antifungica de *Allium sativum* (ajo) y Fluconazol sobre *Candida albicans in vitro*. Se experimentaron concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 mg/ml del extracto. Los resultados hallados determinan que el extracto de *Allium sativum* en todas las concentraciones experimentadas afecta su crecimiento. La Concentración Mínima Inhibitoria (90 %) es de 20 mg/ml, con una letalidad (K) de 0,73.

La actividad antifungica comparada con la del Fluconazol alcanza el 95 %. Se sugiere que el extracto de *Allium sativum* tiene acción semejante al Fluconazol por lo que puede ser utilizada como una alternativa en el tratamiento de enfermedades bucales.

Villanueva Gladis<sup>11</sup> en el 2007, determinó la actividad antibacteriana del extracto de *Allium sativum* sobre el *Streptococcus mutans*, en condiciones *in vitro*. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) siguiendo la técnica de macrodilución, luego la CMI del extracto fue comparada con la CMI de la eritromicina, mediante la técnica de difusión en agar. Se experimentaron concentraciones de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 y 4 mg/ml; en los cuales se inocularon una población de 10 % UFC/ml e incubados a una temperatura de 37 °C por un periodo de 24 horas. Los resultados hallados, demuestran que el extracto de *Allium sativum* altera los parámetros de crecimiento como el Tiempo generacional (Tg) que incrementa en forma proporcional al incremento de la concentración del extracto. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es de 2, 00 mg/ml. Se le atribuye a la allicina como el compuesto que determina la acción antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*, funcionando como un inhibidor de enzimas comprometidas con la respiración celular y síntesis de proteínas.

Ledezma y col<sup>12</sup> en el 2008, evaluaron si el efecto producido por la combinación de ajoene y ketoconazol sobre el crecimiento y la proliferación de hongos filamentosos es de naturaleza aditiva, antagónica o sinérgica. Para ello se investigaron sus interacciones *in vitro* en tres aislamientos de *Microsporium canis* mediante un estudio preliminar utilizando la técnica de microdilución.

Los resultados de concentración inhibitoria fraccional obtenidos para cada una de las tres cepas estudiadas demuestran la existencia de un efecto sinérgico muy potente cuando se combinan estas drogas.

Matthew y col<sup>13</sup> en el 2007, evaluaron el efecto antimicrobiano del extracto de ajo en bacterias entéricas tales como *Escherichia coli*, *Shigella sp*, *Salmonella sp* y *Proteus mirabilis*; utilizando como control positivo al ciprofloxacino y la ampicilina. En este estudio el objetivo era llevar a cabo una evaluación comparativa de los efectos antimicrobianos del ajo contra dos antibióticos de amplio espectro y cuyos mecanismos de acción se sabe que son similares a la del ajo. La Ampicilina fue elegida como una comparación en este estudio porque, de forma similar al ajo, inhibe la síntesis de la pared celular, se inhibe la transpeptidación de enzimas que participan en el entrecruzamiento de las cadenas de polisacáridos de la pared celular bacteriana y también activa enzimas líticas. El ciprofloxacino fue el segundo fármaco elegido porque inhibe la ADN girasa bacteriana, y por lo tanto interfiere con la transcripción del ADN y otras actividades en el ADN.

Los microorganismos utilizados para este estudio fueron aislados de 22 muestras de heces del Hospital Docente Calabar de Nigeria. Las muestras fueron inoculadas en tripticasa soya agar y en agar MacConkey y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La preparación del extracto de ajo fue los dientes de ajo, pelados, cortados en trozos fueron puestos en un extractor de jugo. Usaron la técnica de difusión en discos Whatman de 5mm, fueron impregnados con extracto crudo y secado en un horno de aire caliente a 60 °C durante 5 minutos. La bacteria *E. coli*. fue la más sensible al ciprofloxacino.



La ampicilina fue la menos eficaz contra todos los organismos. La alta sensibilidad al ajo, se exhibió por *Shigella sp* seguido de *Proteus mirabilis* mientras que *P. mirabilis* fue menos sensible. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre la actividad antimicrobiana entre el extracto de ajo y el ciprofloxacino, mientras que la ampicilina fue menos efectiva. Esto se atribuyó a la similitud en el mecanismo de acción de la alicina y el ciprofloxacino.

Fani M. M y col<sup>14</sup> en el 2007, determinaron la actividad inhibitoria del extracto de ajo en *S. mutans* MDR utilizando disco de difusión de 6mm. Utilizaron el ajo fresco pelado (80 g) que fue picado y homogeneizado en 100 ml de agua destilada estéril, centrifugado, filtrado a través de papel Wattman y luego esterilizado por filtración (0.45 micras). El filtrado se mantuvo a -70 °C hasta su uso. Utilizaron un total de 92 aislamientos de *S. mutans*. El perfil de sensibilidad antibiótica de los 92 *S. mutans* aislados se determinaron de acuerdo al método de Bauer-Kirby utilizando los discos de antibióticos. Las zonas de inhibición fueron medidas después de 72 h de incubación a 37 °C. Los antibióticos utilizados fueron la penicilina, amoxicilina, tetraciclina, imipenem, eritromicina, ceftriaxona, clindamicina, rifampicina y vancomicina.

Veinte y ocho cepas de la *S. mutans*, que eran resistentes a cuatro o más de los anteriores antibióticos mencionados se consideraron como cepas MDR. El cultivo puro de cada uno de los aislados de *S. mutans* se sembraron en Mueller-Hinton a la escala equivalente 0.5 de Macfarland. El disco de papel fue empapado en 0,5 ml de extracto de ajo, fue incubado a 37 °C, en presencia de 5 % de CO<sub>2</sub>, por 72 h.

La prueba se repitió tres veces y se determinó el diámetro medio de la zona de inhibición. Fueron usados papeles de filtro empapado en clorhexidina y suero fisiológico, como control positivo y negativo, respectivamente.

En el presente estudio, de 105 dientes cariados, 92 (87,6 %) fueron positivos para *S. mutans*. La menor resistencia observada fue a vancomicina, mientras que la tasa más alta de la resistencia se observó para tetraciclina. De 92 aislamientos, 28 (30,4 %) fueron las cepas MDR, las cuales fueron resistentes al menos a cuatro antibióticos. Diez (35,7 %) aislamientos de MDR fueron altamente resistente a la penicilina (CIM  $\geq$  0,5-2 mg/ml) y 11 (39,2 %) fueron con resistencia intermedia (CIM = 0,5 a 2 mg/ml). El efecto inhibitor del extracto de ajo en 28 cepas MDR de *S. mutans* fue medido mediante el halo de inhibición alrededor de los discos varió de 22 a 44 mm, lo que indica que todos los 28 MDR aislados (100 %) fueron sensibles al extracto de ajo.

D. Jonkers et al<sup>15</sup> en 1999, estudio la influencia del ajo sobre el crecimiento bacteriano en cinco aislamientos clínicos de *H. pylori*. Utilizó ajo fresco, el cual fue pelado y triturado en una licuadora. Después de la filtración, la sustancia se liofilizó y se almacenó a -70 °C hasta su uso. También se utilizaron tabletas comerciales de ajo, las cuales fueron pulverizadas en un mortero. El omeprazol puro, se disolvió en el 96 % de etanol acidificado, 10 - 15 minutos antes de su uso para asegurar la acidificación. La susceptibilidad de *H. pylori* para el ajo se determinó por el método de dilución en agar utilizando placas de agar sangre con sangre de carnero 7 %, que contenían extracto de ajo crudo o el ajo comercial en concentraciones de 0, 1000, 2000, 5000, 10,000, 12,500, 15,000 y 17,500 mg/L.

Las placas de agar se inocularon con 0,01 ml de *H. pylori* en suspensión (McFarland 3) y se incubó durante 4 días a 37 °C bajo condiciones de microaerofilia (5 % O<sub>2</sub>, 10 % de CO<sub>2</sub>). Los valores de CMI se determinó basándose en el contenido de alicina en las tabletas de ajo comercial.

La cantidad de tiosulfatos en el extracto de ajo crudo se determinó por espectrofotometría. El efecto combinado de ajo y omeprazol en *H. pylori* ha sido probado usando caldo infusión cerebro corazón pH 5 con sangre de carnero al 5 %. Combinaciones de ajo (500, 1000, 2000 o 4000 mg/L) y omeprazol (100 o 200 mg/L), así como una suspensión de *H. pylori* (tamaño del inóculo 10<sup>5</sup> ufc/ml) se añadieron. Desde el día 0 hasta el día 7, una muestra de 0,1 mL fue tomada y recuentos bacterianos fueron evaluados semi-cuantitativamente con el método de cinco segmentos. Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

En presencia de omeprazol 100 mg/L, el número de *H. pylori* disminuyó lentamente a cero el plazo de 7 días y un ligero descenso del *H. pylori* se encontró en la presencia de ajo 500 mg/L durante los primeros 24 a 48 h. En presencia del ajo 1 000 mg/L el número de *H. pylori* disminuyó a 0 - 10<sup>1</sup> ufc/ml durante los primeros 3 días, pero volvió a aumentar a partir de entonces. Un efecto sinérgico se encontró cuando ambos omeprazol 100 mg / L y el ajo 500 o 1000 mg/L se añadieron, sin hallar crecimiento bacteriano después de 24 a 48 h. Se observó un efecto inhibidor del crecimiento del *H. pylori* con el ajo. Además, se observó un efecto sinérgico en la combinación del ajo y omeprazol. Sin embargo, ningún efecto sinérgico o antagónico se observó entre el ajo y la amoxicilina, claritromicina o metronidazol.

No se encontraron diferencias en la actividad antibacteriana entre el ajo crudo y el ajo en tabletas comerciales.

El mayor efecto antibacteriano se observó para el extracto de ajo crudo, por tener la mayor concentración de alicina, teniendo un papel importante la alicina en los efectos antibacterianos de ajo.

Bianchi Alberto et al<sup>16</sup> en 1997, realizaron un estudio de los efectos del ajo en el desarrollo del micelio de los siguientes hongos fitopatógenos: *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Colletotrichum lindemuthianum*. Se utilizó para las pruebas una suspensión de polvo micronizado de ajo, que tiene compuestos orgánicos volátiles, compuestos principalmente de aldehídos de cadena lineal, sulfuros de alilo y disulfuros.

El desarrollo del micelio de los hongos se inhibió a una concentración máxima del extracto acuoso de prueba de 100 ml/litro, pero sólo el crecimiento de *P. ultimum* fue bloqueado por completo. La transmisión y microscopía electrónica de barrido reveló alteraciones citomorfológicas de las hifas tratadas con ajo. *R. solani* y *C. lindemuthianum* presentaron hifas derrumbadas, mientras que las de *F. solani* fueron las menos dañadas. Se observó un aumento general de la vacuolización, con la consiguiente reducción en el citoplasma de las células fúngicas tratadas. *R. solani* también reveló un engrosamiento de la pared celular, mientras que *C. lindemuthianum* reveló una acumulación de cuerpos osmóticos inmediatamente debajo de la membrana celular.

## 2.2 BASES TEORICAS

### 2.2.1. Plantas medicinales

Los estudios sobre la actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales de plantas nativas han sido reportados en muchos países, como Brasil, Cuba, India, México y Jordania, que tienen una diversidad de flora y una rica tradición en el uso de plantas medicinales para su uso como antibacteriano o antifúngicos. Ya que las plantas medicinales producen una variedad de sustancias con propiedades antimicrobianas, se espera que los compuestos se usen para el desarrollo de nuevos antibióticos. Sin embargo, las investigaciones científicas para determinar el potencial terapéutico de las plantas son limitadas y hay una falta de estudios científicos que confirman la experimentación posibles propiedades antibióticas de muchas de estas plantas.<sup>12</sup>

En nuestro medio, algunas plantas medicinales en el área de salud dental están siendo utilizadas en diversas formulaciones terapéuticas, así tenemos los enjuagues bucales, colutorios, soluciones tópicas, pasta dental, entre otros. Los aspectos que ofrecen a la población son mejores tanto en el aspecto terapéutico como económico.<sup>17</sup> Así es que Espinosa<sup>18</sup> demostró la actividad antibacteriana de tres extractos de la corteza de *Tabebuia serratofolia* sobre *Streptococcus mutans*.

Rojas R.<sup>19</sup> reporto que la *Caesalpineia spinosa Kuntze* aplicada en forma tópica y como enjuagatorios logra eliminar eficazmente los indicadores clínicos de la gingivitis crónica.

### 2.2.2. *Allium sativum*

El ajo cuya denominación científica es *Allium sativum* L. Pertenece a la familia de las liliáceas, el ajo tiene el bulbo sólido formado de bulbillos limitados por dos caras planas y una convexa, puntiagudos en ambos extremos; tallo erguido, cilíndrico; hojas lisas, estrechas, aquilladas; flores blanquizas o rojizas.<sup>20</sup> El género *Allium* contiene más de 300 especies de plantas; entre ellas se encuentra el *Allium sativum*, cuyas características olorosas permitieron su denominación con el uso del término *allium*, que significa oloroso en latín. Desde épocas remotas esta planta ha coexistido como una parte fundamental de la cultura humana, siendo utilizado por diversas civilizaciones en la elaboración de alimentos, en múltiples preparaciones medicinales.<sup>21</sup>

### 2.2.3 Composición química<sup>2</sup>

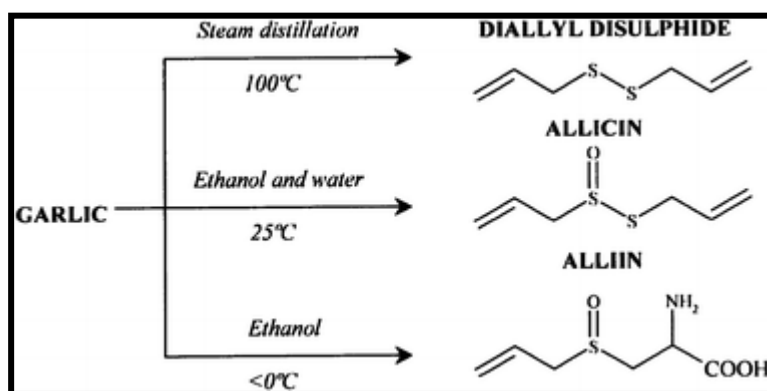
El químico alemán Wertheim llevo a cabo los primeros estudios químicos. Mediante un proceso de destilación al vapor fue capaz de obtener un aceite de olor acre de dientes de ajo.

El propuso el nombre de alilo el hidrocarburo contenido en el aceite y el término todavía se utiliza para describir el  $\text{CH}_2 = \text{CH}$  agrupación hoy  $\text{CHCH}$ .

Un destilado de vapor que tenía propiedades antimicrobianas se obtuvo también por Semmler.

Cavallito y Bailey llevó a cabo el primer estudio definitivo sobre la química del ajo.

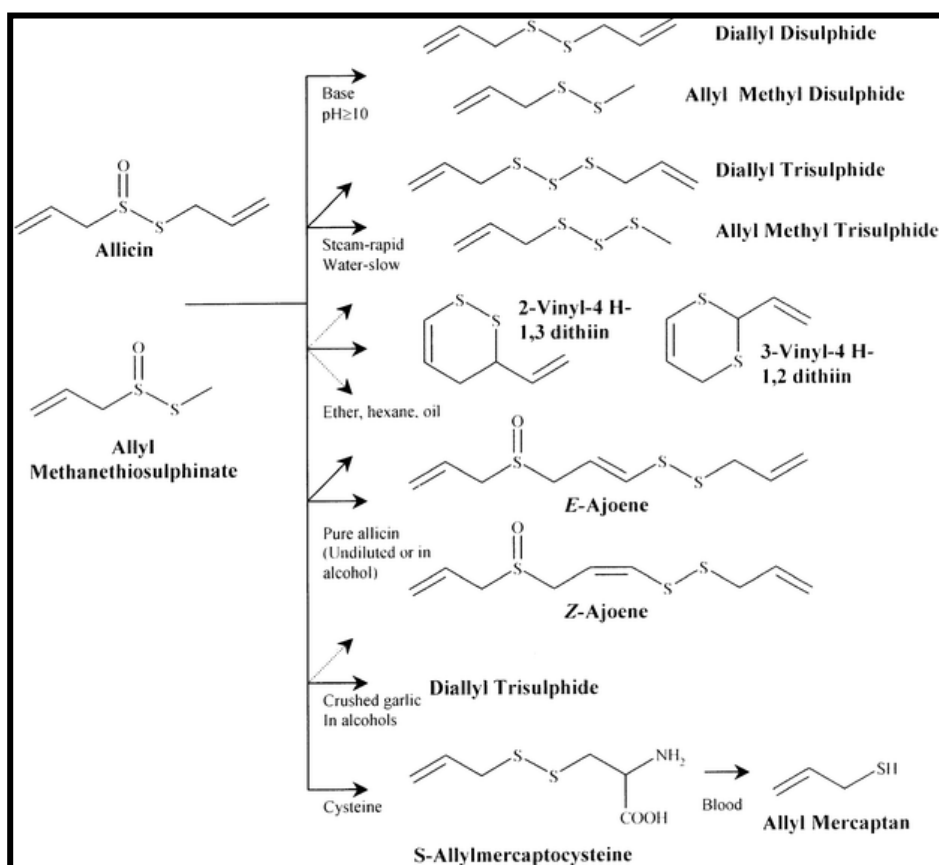
Mediante el empleo de diferentes métodos de extracción (Fig. 1), aislaron disulfuro dialilo, el principal componente del aceite de ajo, la alicina, el componente aislado por Semmler, y aliina un precursor inodoro. Se estableció que el extracto de alcohol etílico que aparecen las propiedades de la mayoría de los antimicrobianos. Este destilado, thiosulfinate dialilo, llamaron a la alicina. El precursor de aliina, un sulfóxido, y la enzima allinasa correspondientes fueron aislados de 4 años más tarde. Varios otros sulfóxidos de cisteína y sus tiosulfatos correspondientes también han sido aislados.



**Fig. 1. Los compuestos de azufre extraído de ajo en diversas condiciones<sup>2</sup>**

Alicina en sí es muy inestable y se descompone rápidamente. Block, utilizo un análogo de la metil-metano thiosulfinate S alicina, para dilucidar las vías de descomposición (Fig. 2).

Otros compuestos se obtienen a partir de ajo por las vías de degradación varían, dependiendo del entorno en el que el extracto existe, por ejemplo, ajoeno y vinilditiínas también han sido aislados.



**Fig 2. Transformación de los principales tiosulfatos en el ajo<sup>2</sup>**

## 2.2.4 Alicina

Uno de los principios activos del ajo fresco picado, tiene una variedad de actividades antimicrobianas. Alicina en su forma pura mostro:

- i) actividad antibacteriana contra una amplia gama de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo cepas resistentes a múltiples fármacos enterotoxigenos de *Escherichia coli*, ii) la actividad antifúngica, especialmente frente a *Candida albicans*, iii) actividad antiparasitaria, incluso algunos de los principales parásitos protozoarios intestinales humanos tales como *Entamoeba*



*histolytica* y *Giardia lamblia*, y iv) la actividad antiviral. El principal efecto antimicrobiano de alicina se debe a su reacción química con los grupos tiol de las enzimas diferentes, por ejemplo, alcohol deshidrogenasa, la tiorredoxina reductasa, y la ARN polimerasa, que puede afectar el metabolismo esencial de la actividad proteinasa de cisteína implicados en la virulencia de *E. histolytica*.<sup>16</sup>

La susceptibilidad al ajo puede depender de diferencias estructurales de las cepas bacterianas. Los polisacáridos y lípidos contenidos en la pared celular tienen un efecto sobre la permeabilidad de la alicina y otros constituyentes de ajo lo que puede ser responsable de la diferencia en la susceptibilidad al ajo, entre las bacterias gram positivas y gram negativas.<sup>13</sup>

Diversas preparaciones del ajo se ha demostrado que exhiben un amplio espectro de actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas como especies de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>22</sup>

### 2.2.5 Ajoene

Aunque el interés científico por los componentes del ajo se remonta a 1844 con los trabajos de Wertheim que condujeron a la identificación del disulfuro de alilo como responsable de su olor característico, no es sino hasta 1945 cuando Cavallito<sup>23</sup> describe la generación de la alicina mediante la acción de la enzima aliinasa.

Posteriormente, en 1983, Apitz-Castro<sup>24</sup> reporta el descubrimiento de una nueva molécula en extractos alcohólicos del ajo poseedora de una potente actividad antiplaquetaria. Posteriormente, esta molécula sería sintetizada en 1986 y se conocería con el nombre de ajoene, una palabra compuesta que relaciona el origen de la molécula, es decir, el nombre popular de la palabra `ajo`, en castellano, con la terminación `ene` indicativa de la presencia de dobles enlaces.

En la actualidad se conocen más de 100 compuestos biológicamente activos derivados del ajo. Sin embargo, la aliina es el compuesto organosulfurado que se encuentra en mayor proporción, el cual es el principio activo básico y constituye el sustrato principal para la enzima aliinasa que, una vez liberada de su compartimiento intracelular por daño o lisis celular, lo transforma en el tiosulfonato alicina, una sustancia inestable, incolora y ópticamente activa que le confiere el olor característico al ajo y a la cual se le han descrito múltiples actividades biológicas.<sup>25</sup>

Aunque el ajoene ha sido evaluado en diversos sistemas experimentales *in vitro*<sup>26</sup> que han permitido conocer algunos datos de la farmacodinamia de este novel compuesto, no ha sido realizado ningún estudio de su farmacocinética. Su naturaleza predominantemente lipófila nos hace suponer que, al igual que la terbinafina, debe alcanzar rápidamente las capas superiores del estrato corneo y penetrar fácilmente en la piel. Los resultados obtenidos en el tratamiento de la onicomycosis causada por levaduras, el ajoene ha mostrado enormes potencialidades de uso como agente terapéutico.<sup>27</sup>

## 2.2.6 Propiedad antimicrobiana del *Allium sativum*

### 2.2.6.1 Propiedades Antiprotozoarias<sup>2</sup>

Varios estudios han demostrado que el extracto a ser eficaz contra una gran cantidad de protozoos como *ranarum Opalina*, *dimidicita O.*, *entozoon Balantidium*, *Entamoeba histolytica*, *tripanosomas*, *Leishmania*, *Leptomonas* y *Crithidia*.

Se llevó a cabo una investigación sobre su posible uso como una antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica*.

Alentados por estos resultados, un ensayo clínico se llevó a cabo en pacientes que habían giardiasis. El ajo se estableció como un anti giardiásica, la eliminación de los síntomas de todos los pacientes dentro de las 24 h, y la eliminación total de cualquier indicio de giardiasis de las heces dentro de las 72 h.

Bajo ciertas condiciones, la alicina, un componente importante de ajo demostrado ser antibacteriano, degrada a dialil trisulfuro. Este producto químico es más estable que la alicina, que es muy volátil y se sintetiza fácilmente. En China se está comercialmente disponible como una preparación llamada Dasuansu y como le ha recetado a las infecciones producidas por *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*.

Alicina, ajoeno y organosulfurados de ajo también son antiprotozoarios eficaces.<sup>2</sup>

#### 2.2.6.2 Propiedades antibacterianas<sup>2</sup>

Más recientemente, el ajo se ha demostrado ser eficaz contra una gran cantidad de grampositivas, bacterias gramnegativas y resistentes a los ácidos. Estos incluyen *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium*, *Mycobacterium* y *Helicobacter*. Se ha documentado que el ajo ejerce una inhibición diferencial entre beneficiosa microflora intestinal y enterobacterias potencialmente nocivos. La inhibición observada en *E. coli* fue de más de 10 veces mayor que la observada en *Lactobacillus casei* para la misma dosis de ajo. La actividad antibacteriana del ajo es ampliamente atribuido a la alicina. Esto es apoyado por la observación de que si se almacena a temperatura ambiente, la eficacia antibacteriana del extracto de ajo es muy reducido. Esta reducción se produce en un grado mucho menor si el extracto se almacena a 0-4 °C, lo que sugiere inestabilidad térmica de los componentes activos. El extracto de ajo y la alicina han demostrado que ejercen efectos bacteriostáticos en algunos enterococos resistentes a vancomicina.<sup>2</sup>

#### 2.2.6.3 Propiedades antifungicas<sup>2</sup>

Muchos hongos han demostrado ser sensibles, incluidos *Candida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*.

El extracto de ajo, demostró disminuir el consumo de oxígeno, reduce el crecimiento del organismo, inhibe la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y dañan las membranas. Una muestra de alicina pura ha demostrado ser antifungica.

La eliminación de la alicina en la reacción de extracción por solventes disminuyó la actividad antifúngica. La actividad también se ha observado con los componentes de ajo, dialil trisulfuro, contra la meningitis criptocócica, y ajoeno, contra *Aspergillus*.

La adición de ajoeno a algunas mezclas inhibe el crecimiento de hongos, como *Aspergillus niger*, *C. albicans* y *Paracoccidioides*, ha dado lugar a la inhibición a concentraciones menores que la experimentada con la alicina. Los estudios realizados con extracto de ajo envejecido (sin alicina o componentes derivados alicina) no mostró actividad in vitro.<sup>2</sup>

#### **2.2.6.4 Propiedades antivirales**

En comparación con la acción antibacteriana de los trabajos de ajo muy poco se ha hecho para investigar las propiedades antivirales. Los pocos estudios han reportado que el extracto de ajo muestra actividad in vitro contra la influenza A y B, el citomegalovirus, rinovirus, el VIH, el virus del herpes simplex 1 y 2, neumonía viral y el rotavirus. Alicina, trisulfuro de dialilo y ajoeno han demostrado ser activa.

El alílico y el disulfuro de dialilo también han demostrado su eficacia contra las células infectadas por el VIH.<sup>2</sup>

### 2.2.7. Microflora bucal- Distribución microbiana<sup>1</sup>

La microbiota de la mucosa oral está constituida, salvo en las encías y los labios, casi exclusivamente por cocos grampositivos anaerobios facultativos y, en especial, por *Streptococos viridans*.

Los labios, al representar una zona de transición de piel a mucosas, estarían colonizados por una microbiota cutánea como *Staphylococcus epidermidis* y por especies de los géneros *Kocuria* y *Micrococcus*; además, se detectan también abundantes *Streptococos viridans* procedentes de la saliva y del dorso de la lengua debido a la acción del humedecimiento labial.

En la mucosa yugal predominan también los *Streptococos viridans*, destacando *Streptococcus mitis*; le siguen en frecuencia *S. sanguis* y *S. salivarius*; también se aislaran otros microorganismos presentes en la saliva.

En el paladar duro existe una microbiota estreptocócica similar a la de la mucosa yugal. En el paladar blando aparecen bacterias propias de las vías respiratorias altas como especies de *Haemophilus*, *Corynebacterium* y *Neisseria*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococos viridans*.

La microbiota de la encía está íntimamente relacionada con la de la placa coronal lisa en la unión dentogingival. El dorso de la lengua ofrece, por sus criptas y papilas, amplias posibilidades para la colonización bacteriana; aproximadamente un 45 % son cocos grampositivos anaerobios facultativos, destacando sobre los demás *S. salivarius*, seguido de *S. mitis*, estreptococos del grupo milleri y es frecuente la detección de *S. mucilaginosus*; le siguen en proporción los cocos gramnegativos anaerobios estrictos (aproximadamente un 16 % de diversas

especies de *Veillonella*) y bacilos grampositivos anaerobios facultativos (en torno a un 12 %, fundamentalmente *Actinomyces spp.*), en menor proporción pueden detectarse diversas especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Fusobacterium* y *Haemophilus*.

En el surco gingival predominan los cocos grampositivos anaerobios facultativos, aproximadamente en un 50 %, sobre todo *S. sanguis*, *S. mitis* y *Streptococcus gordonii* y los bacilos grampositivos anaerobios facultativos (alrededor de un 18 %), entre los que destacan diversas especies del género *Actinomyces*.

La saliva, al carecer de microbiota propia, todos los microorganismos tienen un carácter transitorio que depende de la composición de los otros ecosistemas primarios. En general, predominan los cocos grampositivos anaerobios facultativos (en torno al 44 %), los cocos gramnegativos anaerobios estrictos como *Veillonella spp.* (Alrededor del 15 %), y los bacilos anaerobios facultativos grampositivos (aproximadamente un 15 %), destacando las especies de *Actinomyces*.

Los principales microorganismos que constituyen la microbiota oral son los siguientes:

#### Cocos grampositivos:

Con gran diferencia sobre los demás son los estreptococos del grupo viridans los más aislados, tanto cualitativa como cuantitativamente, de todos los ecosistemas

orales, en menor proporción se hallarían *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *S. mucilaginosus*, *Abiotrophia spp.*, y los anaerobios estrictos *Peptostreptococcus spp.*

#### Cocos gramnegativos:

Se detectan diversas especies, aerobias y comensales no exigentes, del género *Neisseria* y otras pertenecientes al género *Veillonella* como anaerobias estrictas.

#### Bacilos grampositivos:

Numerosos bacilos grampositivos y elementos filamentosos pleomórficos se aíslan de la cavidad oral. Destacan un número amplio de especies de los géneros *Actinomyces* y *Lactobacillus* y, en menor cantidad, *Corynebacterium matruchotii*, *Rothia dentocariosa*, especies de *Propionibacterium* y las pertenecientes a los géneros anaerobios *Eubacterium* y *Bifidobacterium*.

#### Bacilos gramnegativos:

Sobresalen por su importancia los anaerobios estrictos no esporulados como *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Leptotrichia buccalis*, *Selenomonas spp.* y *Centipeda periodontii*. Igualmente destacan como bacterias anaerobias facultativas: *A. actinomycetemcomitans*, *Haemophilus spp.*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga spp.* y algunas especies del género *Campylobacter*.



### Otros microorganismos:

Entre ellos sobresalen los treponemas comensales, hongos como *Candida spp.* que se encuentra en mayor cantidad en lengua, mejilla y paladar<sup>26</sup>, *Micoplasma spp.*, y los escasos protozoos aislados en la cavidad oral como las especies *Trichomonas tenax* y *Entamoeba gingivalis*.<sup>1</sup>

#### **2.2.7.1 *Streptococcus mutans***

Son cocos gram-positivos, no móviles, anaerobios facultativos que pueden metabolizar hidratos de carbono y se considera que es el principal agente etiológico de la caries dental. La cariogenicidad de esta bacteria se asocia a varios factores, incluyendo dextrano, la producción de alta concentración de ácido en la placa y la actividad glucosil transferasa. Son componentes importantes de las biopelículas placa dental que facilitan la adherencia y la acumulación de *S. mutans* y otras bacterias orales. La formación de biopelículas se ve influida por la cantidad de glucosil transferasa producidas por *S. mutans*.<sup>14</sup> Se aísla en el 70-90 % de la población no desdentada y resistente a la caries (portadores).

En individuos con caries activa o especialmente predispuestos su cantidad aumenta significativamente. Se considera el microorganismo cariogénico por excelencia. Por su capacidad de colonizar superficies duras se aísla en la cavidad oral, sobre todo a partir de placas supragingivales, radicales y saliva.<sup>1</sup>

#### **2.2.7.2 *Lactobacillus casei***

Se encuentran en forma constante en la cavidad oral. Se aíslan preferentemente en la saliva, el dorso de la lengua y las placas supragingivales y radicales; su concentración variara según el estado de salud oral, incrementándose con la caries.

Tienen poder acidógeno y acidúrico, inician el crecimiento a pH 5, son particularmente acidófilos y ejercen una débil, pero constante, actividad proteolítica. Algunas cepas sintetizan polisacáridos intra y extracelulares a partir de la sacarosa. Se relacionan con la caries, por la falta de algunos factores de cariogenicidad como su poder adhesivo, una menor significación patogénica que los *Streptococcus* del grupo mutans. Su poder cariogénico es mayor en zonas retentivas en las que quedan atrapados físicamente. Su cantidad en la saliva aumenta en caries activa. Esta bacteria tiene un papel relativo en cuanto al inicio de las lesiones, si son importantes como invasores secundarios cuando, al descender el pH a 5,4 o menos, actúan en la progresión y el avance del frente de caries. Se le ha relacionado con endocarditis subaguda, septicemias y abscesos.<sup>1</sup>

#### **2.2.7.3 *Capnocytophaga sputigena***

Es un bacilo gram-negativo anaerobio facultativo, muestran un aspecto fusiforme, no poseen flagelos, se desarrollan tanto en anaerobiosis como en aerobiosis con 5-10 % de CO<sub>2</sub>. Carecen de catalasa y son oxidasas negativas. Son bacterias sacarolíticas y su capacidad fermentativa de diversos hidratos de carbono y polialcoholes.

Es una de las tres especies más frecuentemente aisladas de la cavidad oral. Su hábitat natural es la cavidad oral, especialmente el surco gingival, en el que se les considera como bacterias periodontopatógenas asociadas a otras.

Sus principales factores de virulencia son:

#### Relaciones interbacterianas:

La excreción de succinato como uno de sus productos finales catabólicos favorece el desarrollo de otras bacterias (p.ej., *P.gingivalis*). Produce bacteriocinas que inhiben el crecimiento de algunas especies (p.ej., *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*), también se han descrito su capacidad de coagregarse con otras bacterias (p.ej., *estreptococos*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces spp* y *P. gingivalis*); de esta forma no solo contribuyen al desarrollo de las placas dentales, sino también a transportar bacterias que carecen de movilidad.

#### Elementos estructurales:

El papel de *Capnocytophaga sputigena* como bacteria periodontopatógena probablemente no sea tan importante como *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*; es posible que su mayor significación sea la de crear condiciones idóneas para que actúen las dos especies señaladas, amén de sumar sus factores de virulencia a los producidos por ellas y otras mas y contribuir, de esta forma, a la progresión de la enfermedad periodontal.<sup>1</sup>

#### **2.2.7.4 *Candida Albicans***

La acción patogénica es diferente en los procesos causados por hongos que forman parte de la microbiota normal de las mucosas humanas (endógenos) que en los originados por los que se multiplican sistémicos en el ambiente (exógenos). La candidiasis constituye un ejemplo del primer caso, ya que *Candida albicans* se encuentran habitualmente colonizando las mucosas humanas. La candidiasis de las mucosas surge cuando se produce una alteración de los mecanismos defensivos, generalmente locales y en algunos casos sistémicos. El producto patológico en el que se sospecha la existencia de un hongo suele sembrarse en agar glucosado de Sabouraud.<sup>1</sup>

## **2.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la práctica de la medicina moderna es alarmante la generación de resistencia de los microorganismos a distintos antibióticos en las terapias de las enfermedades bucales, esto crea la necesidad de encontrar nuevos compuestos que puedan actuar de forma directa sobre la actividad antimicrobiana o inhibiendo los mecanismos de resistencia de los microorganismos, principalmente aquellos con importancia clínica. Las plantas medicinales representan una fuente muy importante para encontrar esta clase de compuestos.<sup>28</sup>

La practica medicinal con plantas, ha sido utilizada desde tiempos muy antiguos dándole a ella una propiedad importante para su uso. Las plantas le han dado un rol fundamental como medio para curar enfermedades en la población tradicional la cual es aproximadamente el 85 %, la cual está incluida la población andina y amazónica de nuestro país.

El ajo tiene propiedades antifúngicas demostrada contra *Candida albicans*, este es un hongo que habita normalmente en cavidad oral. La alteración en el hábitat de este hongo produce enfermedades tales como la candidiasis oral. Ampliando la investigación en diversas bibliografías existen estudios sobre la acción antibacteriana contra *Streptococcus mutans*. Por lo que se planteó estudiar también el efecto antimicrobiano en otras bacterias de la cavidad oral. El ajo es una planta que es fácil de obtener, está al alcance de la población.

Dentro de los estudios realizados con plantas medicinales, son varios los realizados con *Allium sativum* relacionados al campo médico, pero son pocos los estudiados en el campo odontológico para conocer las propiedades antibacterianas y fungicidas. Los componentes del ajo vienen demostrando que poseen acciones antimicrobianas y por la complejidad química de los componentes químicos del ajo y su efectividad del amplio espectro, podría ser utilizado como un antibiótico alternativo.

## 2.4 FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Cuál es el efecto antimicrobiano y antifúngico *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* frente a cepas estándares de la cavidad bucal?

## 2.5 JUSTIFICACION

La salud oral sigue siendo un aspecto fundamental de las condiciones generales de salud en América Latina debido a la importancia que tiene como parte de la carga global de morbilidad oral, los costos relacionados con su tratamiento y la posibilidad de aplicar medidas eficaces de prevención. Dentro de este contexto, la pobreza total en Perú subió de 48,4 % en 2000 a 52,0 % en 2004 y bajo en el 2009 en 34,8 %, siendo mayor en las áreas rurales (73,6 %), este factor se relaciona con las posibilidades de cubrir algún tipo de tratamiento bucal si no es proporcionado por el mismo estado.<sup>29</sup>

La caries dental y las enfermedades periodontales, si bien son prevalentes en toda la población peruana, son más graves entre las personas de bajos ingresos y con poco nivel de instrucción, es probable que sólo se encuentre atención odontológica de calidad en las zonas urbanas y a un costo elevado. Por otra parte, es posible que sea más fácil tener acceso a los proveedores privados, pero los servicios que prestan son, en su mayoría, principalmente curativos y costosos.

Por consiguiente, los grupos de mayores ingresos disponen de mayor acceso a los servicios dentales.<sup>30</sup> La medicina alternativa, en el Perú, tiene una preponderancia muy alta en la población, debido a su accesibilidad y eficacia frente a distintas dolencias.

El presente estudio trata de demostrar la efectividad de la medicina tradicional en la prevención para la preservación de la salud bucal, utilizando el extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* como una alternativa, que beneficie a la población peruana en especial de bajos recursos económicos.

## 2.6 LIMITACIONES

- Escasez bibliográfica de investigaciones científicas en nuestro país, referentes al beneficio de las propiedades del extracto de *Allium sativum* en el campo odontológico.
- Las condiciones de ser un estudio de tipo experimental simulara las condiciones ambientales para el microorganismo utilizando parámetros; a diferencia de lo que puede suceder en condiciones in vivo.

## 2.7 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

### 2.7.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto antimicrobiano y antifúngico del extracto de *Allium sativum* frente a las cepas ATCC de *S. mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, *Lactobacillus casei* y *C. albicans* a diversas concentraciones.

### 2.7.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar el efecto antimicrobiano de las diversas concentraciones del extracto frente las cepas estudiadas para determinar las más efectivas.
- Comparar el efecto antibacteriano del *Allium sativum* frente al ciprofloxacino sobre cepas ATCC de *S. mutans*, *Capnocytophaga sputigena* y *Lactobacillus casei*.
- Comparar el efecto antifúngico del *Allium sativum* frente al fluconazol sobre cepa ATCC de *C. albicans*.

## 2.8 HIPOTESIS

### HIPOTESIS GENERAL

El extracto hidroalcohólico del *Allium sativum* tiene efecto antimicrobiano y antifúngico frente a cepas estándares de la cavidad oral



## III.- MATERIAL Y METODOS

### 3.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio es de tipo experimental, porque se va a valorar el efecto de una o varias variables, donde el investigador manipula las condiciones de la investigación.

Es prospectivo, porque es un estudio longitudinal en el tiempo que se diseña y comienza a realizarse en el presente, pero los datos se analizan transcurrido un determinado tiempo, en el futuro.

Es *in vitro* porque la técnica para realizar un determinado experimento se realiza en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

Se trabajo con grupos controles, un control positivo representado por ciprofloxacino para las bacterias y un antimicótico representado por el Fluconazol, para *Candida albicans* (Hongo) y un control negativo representado por alcohol al 50 %. El grupo experimental representado por el extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* a diferentes concentraciones: 1,2mg/mL, 18mg/mL 30mg/mL, 60mg/mL, 90mg/mL 120mg/mL.

### 3.2 POBLACION Y MUESTRA

POBLACION: Se trabajó con cepas estándares de cavidad bucal

MUESTRA: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Capnocytophaga sputigena* y *Candida albicans* procedentes del American Culture Collection (ATCC) y con el extracto hidroalcohólico del *Allium sativum* a diferentes concentraciones: 1,2mg/mL, 18mg/mL 30mg/mL, 60mg/mL, 90mg/mL, 120mg/mL.

### 3.3 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

#### **VARIABLE INDEPENDIENTE:**

Extracto hidroalcohólico de *Allium sativum*

Cepas estándares de cavidad oral

#### **VARIABLE DEPENDIENTE:**

Acción antimicrobiana (halo de inhibición)

#### **VARIABLE DE CONTROL:**

Control negativo: Alcohol 70° (diluyente del extracto)

Control positivo: Fluconazol (Hongo)

Ciprofloxacino (bacterias)

## OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable	Descripción	Indicador	Unidad de medida	Fuente
<b>Extracto hidroalcohólico</b>	Producto alcohólico obtenido del <i>Allium sativum</i>	Solución alcohólica	mg/ml	Especímenes de <i>Allium sativum</i>
<b>Cepas estándares de cavidad bucal</b>	Microorganismos presentes en la cavidad bucal	Crecimiento en medio de cultivo		Cultivos estandarizados ATCC
<b>Acción antimicrobiana</b>	Efecto del producto en estudio sobre los microorganismos	Inhibición de crecimiento ( halos de inhibición)	mm de diámetro	Cultivo bacteriano y de hongos

### 3.4 MATERIALES

#### 3.4.1. Materiales y Equipos de laboratorio para extraer el extracto hidroalcohólico

- Bulbo de ajo fresco provenientes de la ciudad de Lima
- Licuadora con molinillo marca KAISU 220 V
- Refrigeradora marca COLDEX 15 pulgadas
- Balón de fondo plano marca PYREX

- Beacker
- Balanza
- Frasco de vidrio ámbar 90cc
- Tamizadores
- Equipo de filtrado al vacío (bomba al vacío marca KIELMANN + kit multipore)
- Estufa esterilizadora marca Memmert 20 °C a 250 °C
- Papel filtro Wattman N° 20
- Filtro Millipore

### 3.4.2. Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo

- Balanza
- Agua destilada
- Probetas
- Pipetas
- Vasos de precipitado marca PYREX
- Autoclave vertical de 100 litros de capacidad
- Refrigeradora marca COLDEX 15 pulgadas
- Placas petri
- Tubos de ensayo
- Agar Mueller-Hinton
- Agar Rogosa
- Agar Sabouraud

- Agar Schaedler

### 3.4.3. Materiales y Equipos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana

- Cloruro de sodio al 0,9 %
- Pinzas estériles
- Asa de Kolle
- Placas petri de 150mmx15mm
- Medios de cultivo
- Cepas de las bacterias y hongo
- Mechero Bunsen
- Sacabocado de 11mm
- Extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* a diferentes concentraciones
- Control positivo: Ciprofloxacino y Fluconazol
- Control negativo: Alcohol al 70 %
- Micropipeta
- Escala de Mc Farland
- Vernier

### 3.4.4. Infraestructura

- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la U.N.M.S.M.
- Laboratorio del Centro del control analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.M.S.M.

## 3.5 METODOS

Este estudio se inicio con la obtención del extracto hidroalcohólico:

### 3.5.1. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO

#### 3.5.1.1. Obtención del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* por Maceración

Para la obtención del extracto hidroalcohólico, se utilizaron la instalaciones del centro de control analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.M.S.M., a cargo del Doctor Fritz Choquesillo Peña. El extracto se obtuvo por el proceso de maceración; para el cual se emplearon 500mg de droga (bulbos de *Allium sativum*), que fueron maceradas con una solución hidroalcohólica al 70 %, estos fueron sometidos al proceso de maceración por un periodo de 6 días en un recipiente de vidrio ámbar sin cámara de oxígeno.

#### 3.5.1.2. Purificación del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum*

La purificación del extracto con la finalidad de eliminar el sobrenadante se realizó con un equipo convencional de filtrado empleando papel whatman N°20, en un tiempo aproximado de 20 minutos.

#### 3.5.1.3. Esterilización del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum*

La solución del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* obtenida, se filtra a través de un filtro millipore de diámetro de 0.44µm – 0.22µm, en un tiempo aproximado de 1 hora.

#### 3.5.1.4. Determinación de la concentración del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum*.

Se determinó la concentración del extracto de *Allium sativum* por el método de pérdida por secado (donde se tomó una alícuota del extracto y es sometida a sequedad bajo condiciones controladas).

#### 3.5.1.5. Determinación de los componentes del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum*

Se realizó la marcha fitoquímica para saber los componentes del extracto de *Allium sativum*, los cuales fueron corroborados por cromatografía de capa fina frente a estándares.

#### Marcha fitoquímica

Se trabajó con el extracto hidroalcohólico del *Allium sativum* al 70%, el cual fue macerado por 6 días y purificado.

- Detección de flavonoides

Se realizó un ensayo directo sobre el extracto, usando la reacción de Shinoda.

- Detección de compuestos fenólicos

Se realizó en forma directa y en placa cromatográfica, utilizando como revelador el reactivo Tricloruro Férrico al 1%, y como sistema de solventes cloroformo: benceno (9:1).

- Detección de esteroides y glucósidos triterpénicos

Se realizó en placa cromatográfica, empleando como fase móvil cloroformo: Benceno (9:1) y como revelador el reactivo de Liberman-Burchard.

- Detección de alcaloides

Se efectuó el análisis en Cromatografía de capa fina, empleando como fase móvil cloroformo; Benceno (9:1) y como revelador el reactivo de Dragendorff.

- Detección de taninos

Se realizó en forma directa, usando la reacción de la gelatina.

- Detección de aminoácidos

Se realizó en placa cromatográfica, usando como sistema de solventes 2-Butanol: Ácido Fórmico: Agua (8:1:1) y como revelador reactivo de Ninhidrina.

Después de obtenido el extracto hidroalcohólico, se procedió a la preparación de las cepas ATCC y su posterior reactivación, como se detalla a continuación:



### 3.5.2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

3.5.2.1 Reactivación de las Cepas bacterianas y fúngicas por el método de recuperación en placa donde se trabajó con cepas estándares ATCC (American Type Culture Collection) según las condiciones descritas en la tabla 1

3.5.2.2. Preparación de los medios de cultivo de acuerdo al tipo de microorganismo.

**TABLA 1: Cultivos de Cepas bacterianas ATCC**

MICROORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA	TIEMPO	INCUBACION
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Agar Mueller-Hinton	37 °C	24 horas	Con reactivo para CO <sub>2</sub>
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Agar Sabouraud	37 °C	48 - 72 horas	Aerobiosis
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Agar Rogosa	37 °C	24 horas	Con reactivo para CO <sub>2</sub>
<i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC 33612	Agar Schaedler	37 °C	48 - 72 horas	Con reactivo para CO <sub>2</sub>

### 3.5.3. PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA<sup>31</sup>

#### 3.5.3.1 *Streptococcus mutans* ATCC 25175

En 2ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo se procedió a preparar el inóculo para el desarrollo de la parte experimental.

A partir del cultivo de la placa de agar Mueller-Hinton, con un asa de Kolle se retiró suficientes colonias que fueron colocadas en el tubo de ensayo, hasta que la turbidez fuera igual que la escala 1 de Mc Farland ( $3 \times 10^8$  UFC/ml). Bajo condiciones estériles se procedió a medir con una micropipeta 200  $\mu$ L de suero fisiológico.

Se procedió a medir en una probeta 50ml del Agar Mueller-Hinton mantenido a una temperatura de 45 °C, se agregó el contenido del inóculo del tubo de ensayo, para después verterlo sobre la placa petri de 150mmx 15mm estéril hasta la solidificación.

Una vez solidificado el medio, se procedió a marcar la placa con un plumón indeleble, 8 espacios los cuales correspondieron al extracto al 12mg/mL, 18mg/mL, 30mg/mL, 60mg/mL, 90mg/mL, 120mg/mL, control negativo y positivo.

En condiciones estériles se procedió con un sacabocados de 11mm de diámetro, a formar los 8 pozos los cuales tuvieron una altura de 5mm, luego se colocó en cada pozo 60  $\mu$ L de cada concentración del extracto y los controles. Se dejó reposar aproximadamente 10 minutos.

Este ensayo se hizo por triplicado. Se incubó las 3 placas a 37 °C por 24 - 48 horas.

### 3.5.3.2 *Candida albicans* ATCC 10231

En un tubo de ensayo, que contenía 6ml de suero fisiológico, se procedió a preparar el inóculo para el desarrollo de la parte experimental. A partir del cultivo de la placa de Agar Sabouraud, con un asa de Kolle se retiró suficientes colonias que fueron colocadas en el tubo de ensayo, hasta que la turbidez fuera igual que la escala 0,5 de Mc Farland ( $1 \times 10^4$  UFC/ml).

Se procedió a medir con una micropipeta 2ml de suero fisiológico, bajo condiciones estériles.

Se midió en una probeta 50ml del Agar Sabouraud mantenido a una temperatura de 45 °C, en donde se agregó el contenido del inóculo del tubo de ensayo, para después verterlo sobre la placa petri de 150mm x 15mm estéril hasta la solidificación.

Cuando el medio se solidificó, se marcó la placa con un plumón indeleble, 8 espacios los cuales correspondieron al extracto al 12mg/mL, 18mg/mL, 30mg/mL, 60mg/mL, 90mg/mL, 120mg/mL, control negativo y positivo.

Se procedió con un sacabocados de 11mm de diámetro, a formar los 8 pozos los cuales tuvieron una altura de 5mm, luego se colocó en cada pozo 60 µL de cada concentración del extracto y los controles, en condiciones estériles. Después se dejó reposar aproximadamente 10 minutos.

El ensayo se hizo por triplicado. Se incubó las 3 placas a 37 °C por 24 horas.

### 3.5.3.3. *Lactobacillus casei* ATCC 393:

Se preparó el inóculo en 2ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo, para el desarrollo de la parte experimental. A partir del cultivo de la placa de Agar Rogosa, con un asa de Kolle se retiró suficientes colonias que fueron colocadas en el tubo de ensayo, hasta que la turbidez fuera igual que la escala 1 de Mc Farland ( $3 \times 10^8$  UFC/ml). Bajo condiciones estériles se procedió a medir con una micropipeta 200  $\mu$ L de suero fisiológico.

Se agregó el contenido del inóculo del tubo de ensayo, en una probeta que contenía 50ml de Agar Rogosa, esto mantenido a una temperatura de 45 °C, para después verterlo sobre una placa petri de 150mm x 15mm estéril hasta la solidificación.

Se marcó la placa con un plumón indeleble, 8 espacios los cuales correspondieron al extracto al 1.2mg/mL, 18mg/ mL, 30mg/ mL, 60mg/mL, 90mg/mL, 120mg/mL, control negativo y positivo, una vez solidificado el medio

Con un sacabocados de 11mm de diámetro, se formaron 8 pozos los cuales tuvieron una altura de 5mm, luego se colocó en cada pozo 60  $\mu$ L de cada concentración del extracto y los controles. Se dejó reposar aproximadamente 10 minutos. Todo el procedimiento en condiciones estériles.

Este ensayo se triplico. Se incubó las 3 placas a 37 °C por 24 horas

#### 3.5.3.4. *Capnocytophaga sputigena* ATCC 33612:

Del cultivo de la placa de Agar Schaedler, con un asa de Kolle se retiró suficientes colonias que fueron colocadas en el tubo de ensayo que contenía 2 ml de suero fisiológico, hasta que la turbidez fuera igual que la escala 1 de Mc Farland ( $3 \times 10^8$  UFC/ml). En condiciones estériles, se procedió a medir con una micropipeta 200  $\mu$ L de suero fisiológico.

Luego se midió en una probeta 50ml del Agar Schaedler mantenido a una temperatura de 45 °C, donde se agregó el contenido del inóculo del tubo de ensayo, para después verterlo sobre la placa petri de 150mm x 15mm estéril hasta la solidificación.

Se procedió a marcar la placa con un plumón indeleble, 8 espacios los cuales correspondieron al extracto al 12mg/mL, 18mg/mL, 30mg/mL, 60mg/mL, 90mg/mL, 120mg/mL, control negativo y positivo. Una vez solidificado el medio. Se formaron 8 pozos con un sacabocados de 11mm de diámetro, los cuales tuvieron una altura de 5mm, luego se colocó en cada pozo 60  $\mu$ L de cada concentración del extracto y los controles. Se dejó reposar aproximadamente 10 minutos. Todo bajo condiciones estériles.

El ensayo se triplico. Se incubó las 3 placas a 37 °C por 48 - 72 horas.

### 3.6 ANALISIS DE LOS DATOS

Los datos de las observaciones efectuadas se organizaron para cada una de las cepas y las concentraciones utilizadas. Igualmente se anotaron los resultados de los controles tanto positivos y negativos utilizados. Se elaboraron las tablas y gráficas, usando estadística descriptiva, utilizando el Software SPSS v11.7

Para el análisis se comparó los resultados obtenidos del efecto del extracto de *Allium sativum* frente las diferentes cepas estudiadas, los controles positivos y negativos, utilizando el método de análisis estadístico, los promedios, desviaciones estándar y errores estándar de las variables continuas.

Se utilizó la **Prueba de normalidad** para determinar que los resultados tienen un comportamiento normal (Si P value  $\geq 0,05$ ).

Una vez demostrado que los extractos trabajados a distintas concentraciones tienen un comportamiento normal se procedió al **análisis de igualdad de varianza (prueba de Bartlettts)**. Donde cumple si (Si P value  $\geq 0,05$ ).

Demostrado que los extractos tienen una igualdad de varianza a las distintas concentraciones se procedió a la comparación con la prueba de **Anova** para determinar que concentraciones del extracto tenían una respuesta similar a la de los estándares.

Para los casos donde hubo que hacer comparaciones binarias se utilizó la prueba de **T-student** con la finalidad de demostrar la concentración óptima.

## IV.- RESULTADOS

### 4.1. EXTRACTO DE *Allium sativum*

Se obtuvo 108 g de extracto seco por cada 500 g de droga (bulbo de ajos) macerada en 1500 mL solvente (etanol al 70 %), esto se obtuvo mediante la técnica de maceración, el extracto tuvo las siguientes características organolépticas:

- Color: solución transparente ligeramente amarillenta.
- Olor: sui generis.
- Sabor: ligeramente picante.

#### Marcha fitoquímica

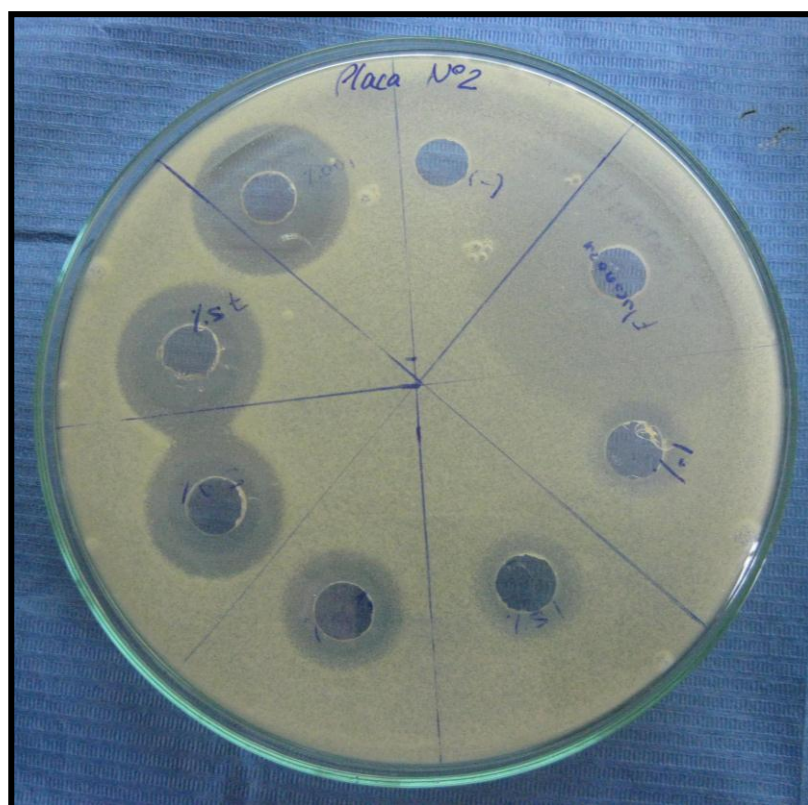
COMPUESTOS	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO
Taninos	+
Aminoácidos	++
Flavonoides	++
Esteroides	-
Compuestos fenólicos	+++
Alcaloides	++

## 4.1.2. ACCIÓN ANTIMICROBIANA

Se estudió el diámetro de los halos de inhibición formado por el extracto de *Allium sativum* distintas concentraciones, teniendo como referente dos controles positivos ciprofloxacino, fluconazol y un control negativo.

### 4.1.2.1. Acción antimicrobiana frente *Candida albicans* ATCC 10231

Se realizaron 3 ensayos válidos para cada concentración donde se obtuvieron los siguientes resultados observados en la Fig. 3, donde se midieron los halos de inhibición, los cuales fueron registrados en la Tabla 2.



**Fig. 3: Formación de halos de inhibición en *Candida albicans* ATCC 10231 en Agar Sabouraud**



**Tabla 2: Tabla de extracto *Allium sativum* vs. Fluconazol en cepas *Candida albicans***

	12mg/ml	18mg/ml	30mg/ml	60mg/ml	90mg/ml	120mg/ml	CONTROL POSITIVO (FLUCONAZOL).	CONTROL NEGATIVO
PLACA Nº 1	13	19	22	23	30	32	34	0
PLACA Nº2	18	19	21	25	27	30	30	0
PLACA Nº 3	16	18	21	25	27	30	32	0
Promedio	16mm	19mm	21mm	24mm	28mm	31mm	32mm	0mm

**Tabla 3: Intervalo de confianza para *Candida albicans***

	IN. DE CONFIANZA	RANGO DE ACEPTACIÓN	
90mg/ml	1,959963985	26,04003602	29,959964
120mg/ml	1,306642656	29,36002401	31,9733093
C.Positivo	2,263171468	29,73682853	34,2631715

Los halos de inhibición tuvieron una media de 16mm, 19mm, 21mm, 24mm, 28mm y 31mm trabajada a las distintas concentraciones (Tabla 2) y el fluconazol tuvo una media de 32mm +/- 2, 26mm (Intervalo de confianza Tabla 3) con los datos se procedió al análisis estadístico de la siguiente manera:

4.1.2.1.1 Prueba de normalidad para cada una de las concentraciones con la finalidad de demostrar que estos tienen una distribución normal (Si P value  $\geq 0,05$ ) demostrando los resultados tienen una distribución normal al 95 % de nivel de confianza.

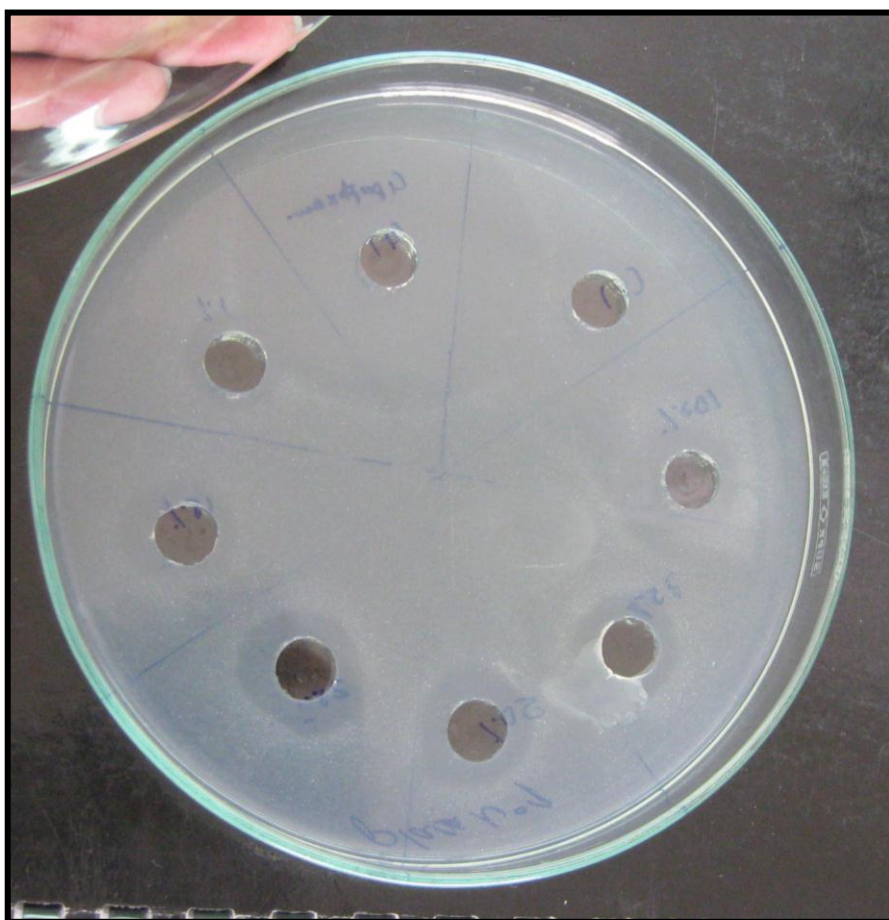
4.1.2.1.2 Prueba de igualdad de varianzas para las distintas concentraciones (**prueba de Bartlett's**) donde al ser evaluados los resultados el P value es  $\geq 0,05$  decimos que la varianza a distintas concentraciones son iguales con un 95 % de nivel de confianza.

4.1.2.1.3. Prueba de Anova donde comparo los resultados obtenidos de cada una de las concentraciones (donde ya se demostró la igualdad de varianza a distintas concentraciones), con esta prueba se demostró que a diferentes concentraciones estadísticamente los resultados no son iguales, pero observamos que a la concentración 90mg/mL y 120mg/mL tienen punto de intersecciones por lo que se va plantear un Re-tets con estos datos.

4.1.2.1.4. Re-Tes Anova entre las concentraciones de 90mg/mL y 120mg/mL comparadas con el estándar demostró que los resultados son estadísticamente iguales con un 95 % de nivel de confianza.

#### 4.1.2.2 Acción antimicrobiana frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Se realizaron 3 ensayos válidos para cada concentración donde se obtuvieron los siguientes resultados observados en la Fig. 4, donde se midieron los halos de inhibición, los cuales fueron registrados en la Tabla 4.



**Fig. 4: Formación de halos de inhibición en *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en Agar Mueller-Hinton**

**Tabla 4: Tabla de extracto *Allium sativum* vs. Ciprofloxacino en cepas *Streptococcus mutans***

	12mg/ml	18mg/ml	30mg/ml	60mg/ml	90mg/ml	120mg/ml	C POSITIVO Ciprofloxacino	CONTROL NEGATIVO
PLACA Nº 1	17	19	23	24	28	30	32	0
PLACA Nº2	16	18	20	22	26	35	33	0
PLACA Nº 3	17	20	20	22	28	30	30	0
Promedio	17mm	19mm	21mm	23mm	27mm	32mm	32m	0mm

**Tabla 5: Intervalo de confianza para *Streptococcus mutans***

	IN. DE CONFIANZA	RANGO DE ACEPTACIÓN	
90mg/ml	1,306642656	26,02669068	28,639976
120mg/ml	3,266606641	28,40006003	34,9332733
C.Positivo	1,728525761	29,93814091	33,3951924

Los halos de inhibición tuvieron una media de 17mm, 19mm, 21mm, 23mm, 27mm y 32mm trabajada a las distintas concentraciones (Tabla 4) y el ciprofloxacino tuvo una media de 32mm +/- 1, 72mm (Intervalo de confianza Tabla 5) con los datos se procedió al análisis estadístico de la siguiente manera:

4.1.2.2.1. Prueba de normalidad para cada una de las concentraciones con la finalidad de demostrar que estos tienen una distribución normal (Si P value  $\geq 0,05$ ) demostrando los resultados tienen una distribución normal al 95 % de nivel de confianza

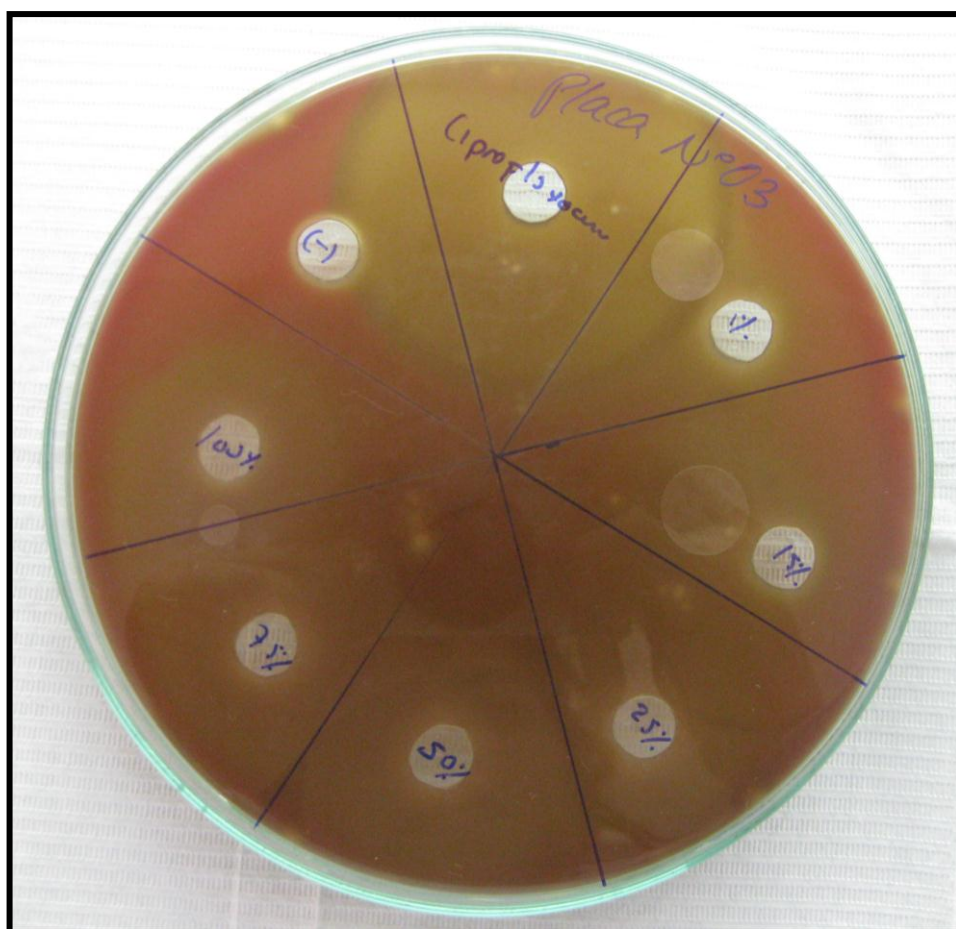
4.1.2.2.2. Prueba de igualdad de varianzas para las distintas concentraciones (**prueba de Bartlett's**) donde al ser evaluados los resultados el P value es  $\geq 0,05$  decimos que la varianza a distintas concentraciones son iguales con un 95 % de nivel de confianza.

4.1.2.2.3. Prueba de Anova donde comparó los resultados obtenidos de cada una de las concentraciones, con esta prueba se demostró que a diferentes concentraciones estadísticamente los resultados no son iguales, pero observamos que a la concentración 90mg/mL y 120mg/mL tienen punto de intersecciones por lo que se va plantear un Re-tets con estos datos.

4.1.2.2.4. Re-Tes Anova entre las concentraciones de 90mg/mL y 120mg/mL comparadas con el estándar demostró que los resultados son estadísticamente iguales con un 95 % de nivel de confianza.

#### 4.1.2.3. Acción antimicrobiana frente *Capnocytophaga sputigena* ATCC 33612

Se realizaron 3 ensayos válidos para cada concentración donde se obtuvieron los siguientes resultados observados en la Fig. 5, donde se midieron los halos de inhibición, los cuales fueron registrados en la Tabla 6.



**Fig. 5: Formación de halos de inhibición en *Capnocytophaga sputigena* ATCC 33612 en Agar Schaedler**

**Tabla 6: Tabla de extracto *Allium sativum* vs. Ciprofloxacino en cepas *Capnocytophaga sputigena***

	12mg/ml	18mg/ml	30mg/ml	60mg/ml	90mg/ml	120mg/ml	C POSITIVO (Ciprofloxacino).	C. NEGATIVO
PLACA N° 1	17	17	31	35	37	43	44	0
PLACA N°2	20	20	32	36	40	46	47	0
PLACA N° 3	20	22	32	35	40	42	43	0
promedio	19mm	20mm	32mm	35mm	39mm	44mm	45mm	0mm

**Tabla 7: Intervalo de confianza para *Capnocytophaga sputigena***

	IN. DE CONFIANZA	RANGO DE ACEPTACIÓN	
90mg/ml	1,959963985	37,04003602	40,959964
120mg/ml	2,355583548	41,31108312	46,0222502
C.Positivo	2,355583548	42,31108312	47,0222502

Los halos de inhibición tuvieron una media de 19mm, 20mm, 32mm, 35mm, 39mm y 44mm trabajada a las distintas concentraciones (tabla 6) y el ciprofloxacino tuvo una media de 45mm +/- 2, 35mm (Intervalo de confianza tabla 7) con los datos se procedió al análisis estadístico de la siguiente manera:

4.1.2.3.1. Prueba de normalidad para cada una de las concentraciones con la finalidad de demostrar que estos tienen una distribución normal (Si P value  $\geq 0,05$ ) demostrando los resultados tienen una distribución normal al 95 % de nivel de confianza

4.1.2.3.2. Prueba de igualdad de varianzas para las distintas concentraciones (**prueba de Bartlett's**) donde al ser evaluados los resultados el P value es  $\geq 0,05$  decimos que la varianza a distintas concentraciones son iguales con un 95 % de nivel de confianza.

4.1.2.3.3. Prueba de Anova donde comparo los resultados obtenidos de cada una de las concentraciones, se observo que a la concentración 90mg/mL y 120mg/mL tienen punto de intersecciones por lo que se va plantear un Re-tets con estos datos.

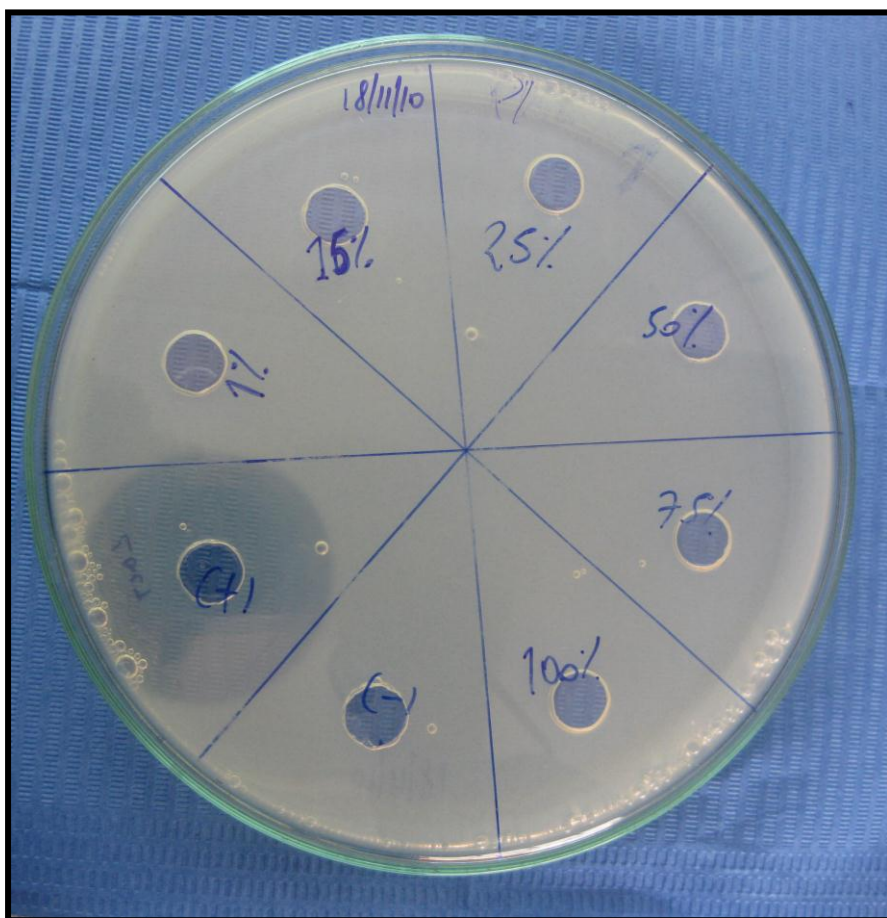
4.1.2.3.4. Re-Tes Anova entre las concentraciones de 90mg/mL y 120mg/mL comparadas con el estándar demostró que los resultados no son estadísticamente iguales.

4.1.2.3.5. Prueba de T-student entre las concentraciones de 90mg/ml y 120mg/mL y el estándar de ciprofloxacino comparadas con el estándar demostró que los resultados son estadísticamente iguales con un 95 % de nivel de confianza.



#### 4.1.2.4. Acción antimicrobiana frente *Lactobacillus casei* ATCC 393

Se realizaron 3 ensayos válidos para cada concentración donde se obtuvieron los siguientes resultados observados en la Fig. 6, donde se midió el halo de inhibición del control positivo, el cual fue registrado en la Tabla 8, donde observamos que no hubo inhibición antibacteriana para el extracto de *Allium sativum*.



**Fig. 6: Formación de halo de inhibición (control positivo) en *Lactobacillus casei* ATCC 393 en Agar Rogosa**

**Tabla 8: Tabla de extracto *Allium sativum* vs. Ciprofloxacino en cepas *Lactobacillus casei***

	12mg/ml	18mg/ml	30mg/ml	60mg/ml	90mg/ml	120mg/ml	C POSITIVO (Ciprofloxacino).	C. NEGATIVO
PLACA N° 1	0	0	0	0	0	0	42	0
PLACA N°2	0	0	0	0	0	0	42	0
PLACA N° 3	0	0	0	0	0	0	43	0
promedio	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	42mm	0mm

## V.- DISCUSION

Actualmente se realizan numerosas investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades antimicrobianas a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un considerable número estudios han evaluado la actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. El *Allium sativum* (ajo), es una planta que se utiliza ampliamente en la medicina tradicional peruana que ha sabido aprovechar su rica flora y su vasta tradición en el empleo de fitofármacos, en esta investigación se propuso validar la actividad antimicrobiana y antifúngica del *Allium sativum* contra *Streptococcus mutans*, microorganismo cariogénico por excelencia,<sup>1</sup> contra *Lactobacillus casei*, bacteria responsable del avance de la caries en la profundidad del esmalte y la dentina,<sup>1</sup> contra *Capnocytophaga sputigena*, bacteria periodontopatogena<sup>1</sup> y contra *Candida albicans*, hongo implicado en la candidiasis oral.<sup>1</sup> Estos microorganismos también fueron estudiados por los siguientes investigadores: Naupari Valdivieso<sup>11</sup> y Villanueva Cruz<sup>12</sup>.

Garcia Rico 2007,<sup>9</sup> evaluó la inhibición del extracto del *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* sobre cinco cepas bacterianas, utilizando el extracto acuoso. En mi investigación, utilicé el extracto hidroalcohólico, sobre 4 cepas. Garcia<sup>9</sup> utilizo una metodología muy similar para la determinación de la actividad antimicrobiana, a la utilizada en este estudio.

En sus resultados, el extracto acuoso de *Allium sativum* presento menor potencial antibacteriano a diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación.

Naupari Valdivieso 2007,<sup>11</sup> estudio el efecto antifúngico del extracto de *Allium sativum* frente a la *Candida albicans*, utilizó concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 mg/mL del extracto, a diferencia de esta investigación donde se utilizó el extracto en concentraciones de 12, 18, 30, 60, 90 y 120mg/mL. Naupari<sup>11</sup> halló que en todas las concentraciones experimentadas, la *Candida albicans* inhibía su crecimiento. En la presente investigación se obtuvo halos de inhibición en todas las concentraciones usadas, pero no todas ellas eran semejantes a la acción antifúngica del fluconazol. Además en ambos estudios se usó al Fluconazol como control positivo. En esta investigación, el extracto de *Allium sativum* dio un promedio de halo de inhibición de 28,3mm en contraste con el estudio de Naupari<sup>11</sup>, el extracto daba un promedio de 23,13mm de halo de inhibición, por lo cual la diferencia no es estadísticamente significativa. Naupari<sup>11</sup> trabajó con el fluconazol a una concentración de 10mg/ml y obtuvo un halo de inhibición de 31,6mm de promedio; a diferencia de la presente investigación donde se trabajó con fluconazol a una concentración de 2mg/ml, produciendo un halo de inhibición de 32mm de promedio. A pesar de utilizar diferentes concentraciones del fluconazol (10mg/ml y 2mg/ml), la diferencia en el promedio del halo de inhibición (31,67mm y 32mm) no es estadísticamente significativa.

Villanueva Cruz 2007,<sup>12</sup> observó la actividad antibacteriana del extracto de *Allium sativum* sobre el *Streptococcus mutans* Villanueva<sup>12</sup> determinó la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) siguiendo la técnica de macrodilución y la técnica de difusión en agar, a diferencia de este estudio que utilizó el método de pozos, propuesto por R.Rojas<sup>31</sup>. Villanueva<sup>12</sup> trabajó con concentraciones de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 y 8 mg/mL, a diferencia del presente estudio donde se utilizó

concentraciones de 12, 18, 30, 60, 90 y 120mg/mL. Villanueva<sup>12</sup> encontró que el halo de inhibición producido por el extracto fue de 17mm de promedio; a diferencia, en el presente estudio el halo de inhibición fue de 23,2mm de promedio, por lo que la diferencia entre ambos no es estadísticamente significativa. Villanueva<sup>12</sup> usando a la eritromicina, como control positivo, halló un halo de 30mm de promedio; en la presente investigación usando al ciprofloxacino, como control positivo el halo hallado fue de 32mm de promedio, por lo que esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Matthew Egbobor 2007,<sup>13</sup> realizó un estudio comparando al extracto de *Allium sativum* frente a antibióticos contra enterobacterias. Utilizó el extracto de *Allium sativum* a una concentración de 1,120 mg/ml. Matthew<sup>13</sup> uso la técnica de difusión en disco; la ampicilina (AMP) y el ciprofloxacino (CPX) como control positivo. En esta investigación se trabajó con la técnica de pozos planteada por R.Rojas<sup>31</sup> y se usó el ciprofloxacino como control positivo. Matthew<sup>13</sup> midió el efecto antimicrobiano mediante la lectura de los halos de inhibición, y sus resultados no mostraron diferencias significativas entre el extracto y el CPX, lo que indica que ambos tienen similares efectos antimicrobianos. En la presente investigación se obtuvo el mismo resultado.

## VI.- CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* presentó efecto antimicrobiano frente a la cepa ATCC de *S. mutans*, *Capnocytophaga sputigena*, y *C. albicans* a excepción de *Lactobacillus casei* que presenta resistencia.
- Se determinó que la concentración antimicrobiana frente al *Capnocytophaga sputigena* fue de 120mg/mL, teniendo como referencia al estándar de ciprofloxacino a una concentración de 4mg/ml
- Se determinó que la concentración antimicrobiana frente a *Candida albicans* fue de 90mg/ml y 120mg/mL, presentando una mejor actividad antimicrobiana a la concentración de 120 mgr/ml teniendo como referencia al estándar de fluconazol a una concentración de 2mg/ml
- Se determinó que la concentración antimicrobiana frente al *Streptococcus mutans* fue de 90mg/ml y 120mg/ml presentando una mejor actividad antimicrobiana a la concentración de 120 mgr/ml teniendo como referencia al estándar de ciprofloxacino a una concentración de 4mg/ml
- Se determinó que el *Lactobacillus casei*, presenta resistencia antimicrobiana frente al extracto de *Allium sativum*, teniendo como referencia al estándar de ciprofloxacino a una concentración de 4mg/ml

## VII.- RECOMENDACIONES

- Hacer estudios para determinar la CMI del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* frente a las bacterias estudiadas: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Capnocytophaga sputigena* y *Candida albican*; y realizar trabajos posteriores con mayor cantidad de ensayos, que los que se emplearon en este estudio.
- Determinar el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* frente a otros microorganismos patógenos de importancia oral. Además realizar estudios posteriores con las otras especies de *Allium sativum*.

## VIII.- BIBLIOGRAFIA

- (1) Liébana Ureña J. Microbiología oral. Segunda edición. España. Edit. McGraw-Hill. 1995. 677 pags.
- (2) J. C. Harris, S. L. Cottrell, S. Plummer, D Lloyd. Antimicrobial properties of *Allium sativum*. Appl Microbiol Biotechnol 2001; 57:282-286.
- (3) García Huaman G. Respuesta tisular a una pasta tópica a base de *Plantago mayor L.* y *Virus paradisi* en gingivitis inducida en lagomorfos. Tesis de licenciatura en Odontología. Lima: Universidad de San Martín de Porres; 2003.
- (4) Villalobos Octavio J, Salazar C R y Ramírez G. Efecto de un enjuague bucal compuesto de *Aloe vera* en la placa bacteriana y la inflamación gingival. Acta Odontológica Venezolana 2001; 39:(3)
- (5) Días Ledesma K. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de *Minthostachys Griseb* (Muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. Tesis Bachiller. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2005.
- (6) Ledezma E, Apitz R. Del folklore al mecanismo molecular: el ejemplo del ajoene. Interciencia 1998; JUL-AUG,(4): 227-231
- (7) Lemus,D y col. Susceptibilidad in Vitro al ajoene de aislados de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* y *C. Krusei* obtenidos de pacientes con onicomicosis y su relación con el tratamiento tópico. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. V24 n. 1-2 Caracas ene. 2004.
- (8) Mercado Sively. Efecto antibacteriano in Vitro del ajo (*Allium sativum*) en la microflora bacteriana salival. Tesis. Facultad de Odontología. Universidad Santa María. Perú. 2008



- (9) García Rico. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: Estudio preliminar in Vitro. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, julio-diciembre, año/Vol.5, numero 002, pag. 68-79.
- (10) Naupari Valdivieso Amparo Evelyn. Acción antifúngica de *Allium sativum* y Fluconazol sobre *Candida albicans* in Vitro. Tesis para optar el titulo profesional de cirujano dentista. Lima: Universidad San Martin de Porres; 2007
- (11) Gladys Villanueva Cruz. Acción antibacteriana del extracto de *Allium sativum* sobre *Streptococcus mutans* in vitro. Tesis para optar el titulo profesional de cirujano dentista. Lima: Universidad San Martin de Porres; 2007.
- (12) Ledezma Eliades y col. Sinergismo entre ajoeno y Ketoconazol en aislamiento de *Microsporum canis*. Un estudio preliminar mediante la determinación de la concentración inhibitoria fraccional (CIF). Revista Iberoamericana Micologica 2008; 25:157-162
- (13) Matthew Egbobor Eja, Bassey E Asikong, Clement Abriba. A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic(*Allium sativum*) and antibiotics on diarrheagenic organisms. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2007; vol 38 N°2 March; 343-348.
- (14) Fani M. M, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. J Indian Soc Pedod Prevent Dent 2007, December; 164-168.
- (15) D. Jonkers, E. van den Broek, I. van Dooren, C. Thijs. Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1999; 43, 837-839.

- (16) Bianchi Alberto, Zambonelli Alessandra, Zechini D'Aurelio Aldo. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. Plant disease 1997, November, vol81 N°11; 1241-1246.
- (17) Calixto Cotos Maria Rosario. Plantas medicinales utilizadas en odontología. Kiru 2006;3(2)pag 80-86.
- (18) Espinosa Rivero I. Actividad antibacteriana del extracto de *Tabebuia serratifolia* (Tahuari) sobre el *Streptococcus mutans*. Estudio in Vitro. Tesis de licenciatura en Odontología. Lima: Universidad de San Martin de Porres; 2007
- (19) Rojas Rueda J. Estudio clinico experimental con *Caesalpineia spinosa Kuntze* "Tara" en el Centro de Salud Max Arias Schreiber 1999. Tesis de licenciatura en Odontología. Lima: Universidad de San Martin de Porres; 1999.
- (20) E. Falcon Manuel. Plantas medicinales y sus aplicaciones. Tercera edición. Lima. Edit. La providencia. 1928. 237 pags.
- (21) Ledezma E, Apitz R. Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 75-80
- (22) Ankri Serge, Mirelman David. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes and Infection; Volume 1, Issue 2, February 1999, Pages 125-129.
- (23) Cavallito CJ, Bailey JHA, Allicin the antibacterial principle of *Allium sativum*. I Isolation physical properties and antibacterial action. J Am Chem Soc 1944;66: 1950-1951.

- (24) Apitz-Castro R, Cabrera S, Cruz MR, Ledesma E, Jain MK, Effects of garlic extract and three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure. *Thromb Haemostas* 1983; 32:155-169.
- (25) Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:564-82.
- (26) Salazar Vasquez Mariela y col. Presencia de hifas de candida en adultos con mucosa oral clínicamente saludable. *Rev. Estomatol. Herediana* 2005 (15):1 Pag.22-34
- (27) Ledezma E, Marcano K, Jorquera A, De Sousa L, Padilla M, Pulgar M, Apitz-Castro R. Efficacy of ajoene in the treatment of *Tinea pedis*; a double-blind and comparative study with terbinafine. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43; 829-832.
- (28) Navarro V., Villarreal M.L., Rojas G., Xavier B L. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases, *J. of Ethnopharmacol* 1996; 53(3): 143-147.
- (29) <http://www.paho.org/hia/archivosvol2/paisesesp/Per%C3%BA%20Spanish.pdf> Acceso 20/02/10
- (30) <http://www.paho.org/Spanish/GOV/CD/doc259.pdf> Acceso 20/02/10
- (31) Rosario Rojas, et al. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. October 2003, Volume 88, Issues 2-3, Pages 199-204

## IX.- ANEXOS



**Fig. 7:** Especímenes de *Allium sativum*



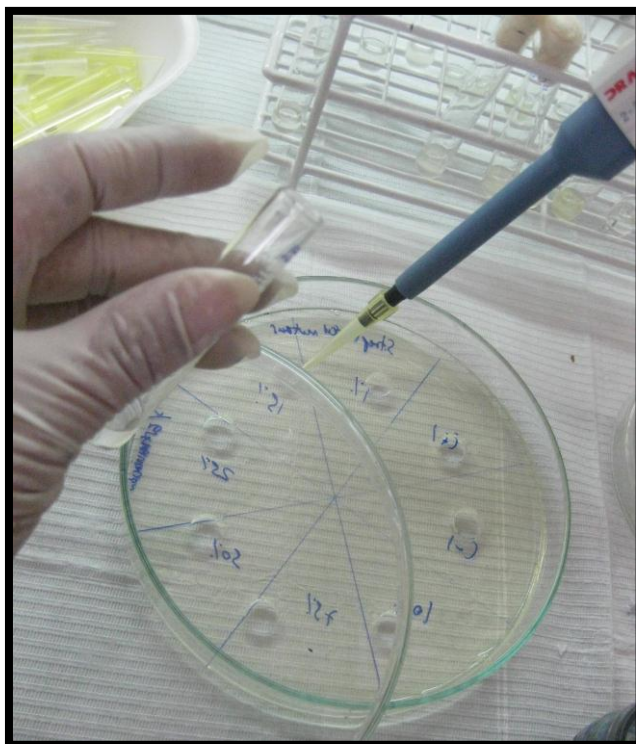
**Fig. 8:** Obtención del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum*  
por Filtración en bomba al vacío



**Fig. 9: Esterilización del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum***



**Fig. 10: Batería de tubos de ensayo conteniendo las diferentes concentraciones del extracto y los controles**



**Fig. 11: Se colocó en cada pozo 60  $\mu$ L de cada concentración del extracto y los controles**